**《****兔出血症诊断技术》编制说明**

注：提交时黑色和蓝色字均不可删减。没有的应写“无”。

# 一、工作简况

## （一）任务来源

兔出血症（RHD），俗称兔瘟，是由兔出血症病毒（rabbit hemorrhagic disease virus，RHDV）引起的一种以急性、高度传染性、大面积死亡为特征的兔传染病，我国农业农村部573号令颁布为二类疫病，国际动物卫生组织（WOAH）将该病列为B类传染病。1984年，兔出血症最先在中国公开报道，1986年，在欧洲意大利爆发，随后传遍整个欧洲并波及全球。RHDV属于杯状病毒科兔病毒属成员。当前引起RHD的RHDV有GI.1（RHDV1）和GI.2（RHDV2）两个基因型。截至2010年，分离株属于GI.1基因型。2010年，在欧洲发现了一种新的变异RHDV，该毒株在系统发育和抗原方面与GI.1基因型不同，被命名为RHDV2或RHDVb，属于GI.2基因型。

RHDV1主要感染2月龄以上家兔，其特点是高度传染性，高致死率（死亡率高达90%），潜伏期1～3天，体温升高后12～36小时死亡，仅有少数兔子幸存，存活率约5～10%。RHDV感染小于4～5周龄兔子主要呈现亚急性感染、不表现临床症状。RHD临床症状主要表现为肝脏坏死，所有组织器官可见严重的弥漫性血管内凝血，最严重的病变在肝脏、气管和肺脏，几乎所有的器官有出血并伴有血液凝固不良。

RHDV2可感染不同日龄家兔。7~15日龄（未断奶家兔）以上家兔感染RHDV2，死亡率可达90%。RHDV2感染死亡兔的典型症状与RHDV1毒株感染相似。目前RHDV1毒株制备的相关兔出血症疫苗对新毒株RHDV2感染的保护性较弱。兔出血症2型已给世界养兔业造成了极大的经济损失。RHDV2还可以跨物种感染野兔、地中海松田鼠和白齿鼩，通过食物链的传递对野生动物种群的生态分布也造成了一定影响。

我国于2020年首次报道了RHDV2 的出现，由于RHDV1毒株制备的疫苗对RHDV2的交叉保护作用有限，因此RHDV2迅速在中国多个省市流行。目前，国内处于RHDV1和RHDV2两种基因型共同流行的状态。因此，应加快RHDV诊断技术的修订和标准化进程。

团队多年来一直关注RHDV在我国和世界其他地区的流行态势。团队带头人王芳研究员在不同级别的学术会议及培训会议中不断宣传RHDV2的危害。2016年在《江苏农业科学》发表《兔出血症病毒新毒株RHDV2的流行与控制》，在《江苏农业学报》发表《兔出血症病毒经典毒株和变异毒株的RT-PCR 鉴定》等文章；同时，团队还建立了“RHDV2普通RT-PCR检测方法”和“兔出血症病毒变异毒株（RHDV2）荧光定量检测方法”，结合早期团队已建立的RHDV1检测方法，可以满足对家兔及其产品样本中RHDV1和RHDV2的检测。**鉴于团队在RHDV2的诊断与控制做了良好的前期研究和技术储备，****使得在我国新发生的RHDV2感染病例在短时间内得到确诊，同时也是对建立的诊断技术的实战验证，**为该病流行情况监测提供了可靠的方法。

本项目对目前实施的由中华人民共和国农业行业标准《兔病毒性出血病血凝和血凝抑制试验方法》（NY/T 572-2016）和《兔病毒性出血症病毒RT-PCR检测方法》（NY/T 2960-2016）进行修订。修订内容主要包括：**依据《一、二、三类动物疫病病种名录》（农业农村部公告第573号）将本项目中名称兔病毒性出血症修改为兔出血症**；兔出血症病毒1型的RT-PCR检测方法；增加了兔出血症病毒2型的血凝和血凝抑制试验方法及RT-PCR检测方法；增加了兔出血症病毒1型和2型TaqMan探针实时荧光定量RT-PCR检测方法。对已实施的标准，进行以上修订，具有重要意义，主要体现在兔出血症病毒1型和2型的检测及分型鉴定，对指导该病的防控及流行病学调查至关重要。修订后的标准规定了兔出血症诊断技术操作规程，适用于兔出血症流行病学调查、诊断、检疫及病原鉴定。

## （二）起草单位和主要起草人及其所做的工作

1. 起草单位

江苏省农业科学院兽医研究所、中国动物卫生与流行病学中心。

2.主要起草人及其所做的工作

项目主持人：王芳：江苏省农业科学院兽医研究所，主持本标准的制定与编写，负责标准项目进度、标准技术参数质量把关等。

参加者：

胡 波：江苏省农业科学院兽医研究所，负责兔出血症病毒RT-PCR检测方法优化与应用。

王志亮：中国动物卫生与流行病学中心，负责标准的制定及技术的指导和验证。

宋艳华：江苏省农业科学院兽医研究所，负责兔出血症病毒RT-PCR检测方法建立及优化。

陈萌萌：江苏省农业科学院兽医研究所，负责兔出血症病毒TaqMan探针实时荧光定量RT-PCR检测方法建立及优化。

邵卫星：中国动物卫生与流行病学中心，负责标准的制定和验证。

魏后军：江苏省农业科学院兽医研究所，负责兔出血症病毒TaqMan探针实时荧光定量RT-PCR检测方法优化与应用。

范志宇：江苏省农业科学院兽医研究所，负责临床样品收集及验证检验。

仇汝龙：江苏省农业科学院兽医研究所，负责临床样品的验证检验。

朱伟峰：江苏省农业科学院兽医研究所，负责临床样品的验证检验。

## （三）主要工作过程

要按标准各阶段为单位分别编写。列出各阶段的关键内容。征求意见、审查阶段的主要内容要详细给出。征求意见要对征求对象的代表性、回复情况、意见处理情况进行总结说明。

1. **起草阶段**

标准的核心部分为兔出血症1型和2型诊断技术，编制过程分三个步骤进行：

第一、中国出现兔出血症2型之前，主要进行各种实验室诊断方法的建立及初步应用。

第二、中国出现兔出血症2型之后，主要进行各种实验室诊断方法的修订和验证。

第三、应用建立的方法对大量临床样品进行检测，验证方法的可靠性。

1. **征求意见阶段**

2.1 征求对象的代表性 本标准征求意见稿征求了20个单位的专家的意见。这些单位中有包括中国农业大学、南京农业大学和山东农业大学等9所高校，农科院等科学研究院系列的单位5家，省级动物疫病预防控制中心2家，省级畜牧总站1家，市级畜牧兽医站2家，海关动植物与食品检测中心1家。征求对象包括科研院所等研究单位，还有各级检测机构等，具有较好的代表性。

2.2回复情况 发送《征求意见稿》的单位数给20 个单位，收到回函的单位数20个，回函并有建议或意见的单位数20个。

2.3 意见处理情况 征集到意见 69条，其中同意采59 条，占 85.51 %；未采纳9条，占13.04 %；1条部分采纳，占 1.45 %，同时对未采纳和部分采纳者均在备注栏中均做了说明。

1. ~~审查阶段（此次不写本部分）~~
2. ~~报批阶段（此次不写本部分）~~

# 二、标准编制原则和确定标准主要内容的依据

## （一）标准的编写原则

主要阐述标准制定或修订过程遵循的基本原则。

本标准按照GB/T 1.1-2020给出的规则起草。

## （二）提出本标准主要内容的依据

主要内容包括技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法、检验规则等。依据包括试验和统计数据。尤其注意本条不要写成任务来源。

2020年以前，中国流行由兔出血症病毒1型引起的RHD 1型，团队建立了一系列兔出血症病毒核酸和蛋白识别技术，并制订和修订兔出血症病毒相关的农业行业标准和江苏省地方标准等，加之疫苗的广泛使用，兔出血症得到了较好的控制。2020年，中国出现兔出血症2型，造成家兔大量死亡，给养殖业带来巨大的经济损失。团队对兔出血症2型流行病学特点进行现场调研，观察收集临床症状，细致研究病理学变化，建立和验证综合性实验室诊断方法，所有技术指标及方法等均有可靠试验来源：

1. 血凝（HA）和血凝抑制（HI）试验

采用不同动物和人不同血型的红细胞，建立适于RHDV1和RHDV2毒株使用的血凝试验方法，以分离的RHDV1和RHDV2毒株或表达的重组VP60蛋白，进行血凝（HA）试验验证；采用抗兔出血症病毒1型特异性血清、抗兔出血症病毒2型特异性血清，分别对RHDV1和RHDV2毒株进行血凝抑制（HI）试验，检验两种特异性血清对RHDV1和RHDV2血凝特性的抑制作用。综合实验研究结果确定了相关标准。

RHDV1选用人O型或B型红细胞于2～8℃条件下进行凝集试验较为适宜；兔出血症病毒2型，RHDV2选用人B型红细胞在2～8℃条件下进,凝集试验较为适宜。鉴于与国内外相关标准保持一致原则，本标准采用人O型或B型（首选B型）红细胞于2～8℃条件下进行凝集试验。

②RHDV1的血凝特性能被抗兔出血症病毒1型特异性血清、抗兔出血症病毒2型特异性血清抑制；RHDV2的血凝特性能被抗兔出血症病毒2型特异性血清抑制，不能被抗兔出血症病毒1型特异性血清抑制。因此，HI试验可以对RHDV1和RHDV2进行鉴别。

2. RHDV1和RHDV2核酸识别技术

①RT-PCR方法 该方法建立初期参考和使用OIE《陆生手册》（最新版）3.6.2兔出血症章节中的引物序列，但是从临床检测结果发现，该引物不能检出我国流行的一些RHDV2毒株，因此，在我们对流行毒株进行测序分析的基础上，重新设计引物并，目前该方法已对采集的大量中国流行RHD1和RHD2病死兔肝脏样品进行检测，实验证明建立的方法稳定，能检出所有的分离株。

②TaqMan探针实时荧光定量RT-PCR 用建立的方法对采集的大量中国流行RHD1和RHD2病死兔肝脏样品进行实验验证，综合实验研究和验证结果制定了相关标准。就该方法对与RHDV1和RHDV2同源性较高的兔杯状病毒（RCV）是否能检出的问题，由于团队目前没有保存RCV，我们下载了相关序列并进行了分析，发现RHDV1和RHDV2探针序列之间以及与相近的兔杯状病毒间均不同（见下图1和图2），说明该方法特异性较好。

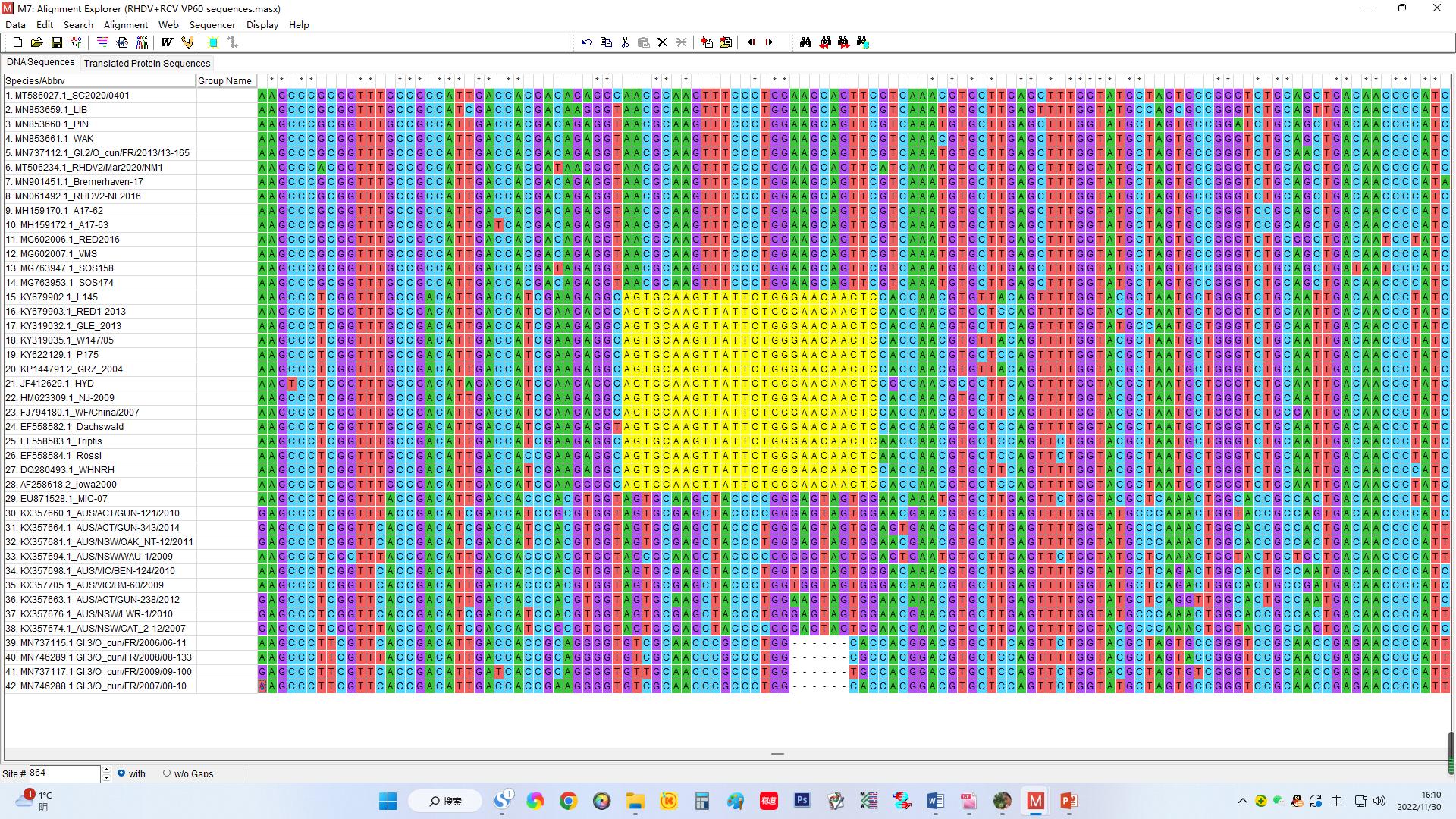


图1 RHDV1型探针序列（黄色碱基序列）与RHDV1、RHDV2和RCV衣壳蛋白序列比对结果

1-14：RHDV2衣壳蛋白序列；15-28：RHDV1衣壳蛋白序列；29-42：RCV衣壳蛋白序列

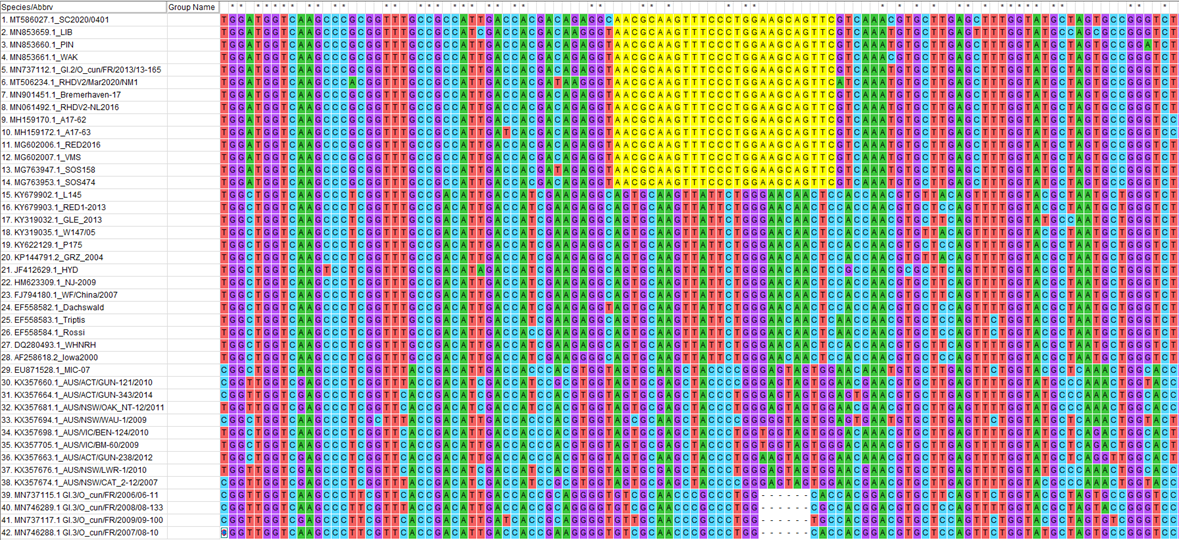


图2 RHDV2型探针序列（黄色碱基序列）与RHDV1、RHDV2和RCV衣壳蛋白序列比对结果

1-14为RHDV2衣壳蛋白序列；15-28为RHDV1衣壳蛋白序列；29-42为RCV衣壳蛋白序列

两种方法均可在同一个体系中对两种病毒进行检测，显著提高了检测速度，缩短了检测时间，具有较好的应用价值，有利于疫病的快速诊断和有效防控。

3. 临床症状

3.1 流行病学特点 对发病地区的疫情，进行非接触性调研，了解疫病流行情况，参考文献描述状况，总结我国该病的流行特点。

3.2 临床症状和病理学变化 使用不同日龄的动物进行回归试验时，安装全程监控系统，对RHDV1和RHDV2的发病全过程进行监控，深入了解不同血清型RHDV感染兔的临床表现，同时采集死亡兔各组织器官，制备病理切片，研究病理学变化，综合实验研究结果制定了相关标准。

## （三）新旧标准对比（适用于修订标准的情况）

新标准与旧标准对比，主要内容为修改了RHDV1 RT-PCR检测方法，增加了RHDV2红细胞凝集试验、RHDV2 RT-PCR检测方法，并增加了RHDV1和RHDV2的TaqMan探针实时荧光定量RT-PCR检测方法。中国出现RHD2之前，旧标准对该病临床样品的红细胞凝集检测和核酸检测仅适用于RHDV1，2020年首株RHDV2在中国出现后，旧标准《兔病毒性出血病血凝和血凝抑制试验方法》（NY/T 572-2016）不适用于新毒株的检测，但旧标准《兔病毒性出血症病毒RT-PCR检测方法》（NY/T 2960-2016）可以检测出RHDV1，但是不能检出RHDV2。另外，由于RHD1疫苗无法对RHDV2起到良好的保护作用，因此，在临床上确定感染病例是由RHDV哪种血清型感染对于后续防控和流行病学调查十分重要。在旧标准的基础上修订的新标准可以确定血清型，同时已在临床样品检测中进行了大量的应用，适用于我国兔出血症病毒的鉴别诊断。

# 三、主要试验或验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

**（一）主要试验或验证的分析**

**1 血凝（HA）和血凝抑制（HI）试验**

兔出血症病毒（RHDV）具有凝集红细胞的特性，RHDV最简单、最经典的检测方法是血凝试验（HA）。用杆状病毒表达系统表达的RHDV VP60蛋白能形成病毒样粒子（VLP），该VLP也具有与RHDV相同的血凝特性，可以用HA对重组VP60蛋白进行表达量的检测。为确定人各型红细胞对RHDV1、RHDV2及重组1型VP60蛋白、重组2型VP60蛋白的敏感度，我们在不同温度进行红细胞凝集对比试验。同时考虑到人血使用过程中可能具有生物安全的风险以及获取困难等因素，本试验用RHDV1、RHDV2及重组1型VP60蛋白、重组2型VP60蛋白与兔、绵羊、鸡、小鼠、豚鼠、猴红细胞以及人红细胞进行对比血凝试验，研究用其它动物红细胞取代人红细胞的可行性。RHDV1与RHDV2是不同的血清型， RHDV1和重组1型VP60蛋白的血凝特性能否被抗兔出血症病毒2型特异性血清抑制？RHDV2和重组2型VP60蛋白的血凝特性能否被抗兔出血症病毒1型特异性血清抑制？我们将通过血凝抑制试验和特异性试验对此进行研究。

**1.1 材料**

1.1.1 红细胞

人O型、A型、B型及AB型红细胞由南京市某医院提供；兔、绵羊、鸡、小鼠及豚鼠红细胞由本单位制备并保存；恒河猴红细胞由苏州西山中科实验动物有限公司提供。

1.1.2 毒株

兔出血症病毒1型WF/2007株毒种、兔出血症病毒2型SC2020/04株毒种，均由江苏省农业科学院兽医研究所保存。

**1.2 方法**

1.2.1 重组VP60蛋白的制备

重组兔出血症病毒1型VP60杆状病毒（BAC-WF株）表达的重组1型VP60蛋白、重组兔出血症病毒2型VP60杆状病毒（BAC-SC株）表达的重组2型VP60蛋白，均由江苏省农业科学院兽医研究所制备保存。

1.2.2 阳性血清

抗兔出血症病毒1型特异性血清、抗兔出血症病毒2型特异性血清，均由江苏省农业科学院兽医研究所制备保存。

1.2.3 血凝试验

1.2.3.1 兔出血症病毒及重组VP60蛋白与人各型红细胞不同温度下的凝集试验

取WF/2007株、SC2020/04株毒种及重组1型VP60蛋白、重组2型VP60蛋白，分别与3份不同来源的人O型、A型、B型及AB型红细胞，在2～8℃、20～25℃及35～37℃条件下进行红细胞凝集试验。

1.2.3.2 兔出血症病毒及重组VP60蛋白与不同动物红细胞的凝集试验

取WF/2007株、SC2020/04株毒种及重组1型VP60蛋白、重组2型VP60蛋白，分别与人O型、人B型、兔、绵羊、鸡、小鼠、豚鼠及恒河猴红细胞，在2～8℃条件下进行红细胞凝集试验。

1.2.4 血凝抑制试验

1.2.4.1 兔出血症病毒及重组VP60蛋白与阳性血清的血凝抑制试验

取WF/2007株、SC2020/04株毒种及重组1型VP60蛋白、重组2型VP60蛋白，分别与抗兔出血症病毒1型特异性血清、抗兔出血症病毒2型特异性血清进行血凝抑制试验，以SPF兔血清作为阴性对照。

1.2.4.2 兔出血症病毒1型及重组1型VP60蛋白的特异性试验

分别将WF/2007株毒种、重组1型VP60蛋白用PBS（0.01 mol/L，pH值7.0～7.2）稀释为4个血凝单位的悬液，与等量的抗兔出血症病毒1型特异性血清（用PBS稀释至HI抗体效价为1:128，下同）、抗兔出血症病毒2型特异性血清（用PBS稀释至HI抗体效价为1:128，下同）充分混匀，同时设立4个血凝单位的WF/2007株毒种对照组、4个血凝单位的重组1型VP60蛋白对照组、抗兔出血症病毒1型特异性血清对照组、抗兔出血症病毒2型特异性血清对照组、无特定病原体（SPF）兔肝悬液上清对照组， 37℃作用30～60分钟，其间振摇2～3次，将以上各组加入U型96孔微量反应板，每孔50 µl，至少5孔，然后每孔再加入1%人O型或B型红细胞25 µl，置2～8℃作用45～60分钟，观察结果。

1.2.4.3 兔出血症病毒2型及重组2型VP60蛋白的特异性试验

分别将SC2020/04株毒种、重组2型VP60蛋白用PBS（0.01 mol/L，pH值7.0～7.2）稀释为4个血凝单位的悬液，与等量的抗兔出血症病毒1型特异性血清（用PBS稀释至HI抗体效价为1:128，下同）、抗兔出血症病毒2型特异性血清（用PBS稀释至HI抗体效价为1:128，下同）充分混匀，同时设立4个血凝单位的SC2020/04株毒种对照组、4个血凝单位的重组2型VP60蛋白对照组、抗兔出血症病毒1型特异性血清对照组、抗兔出血症病毒2型特异性血清对照组、无特定病原体（SPF）兔肝悬液上清对照组，37℃作用30～60分钟，其间振摇2～3次，将以上各组加入U型96孔微量反应板，每孔50 µl，至少5孔，然后每孔再加入1%人B型红细胞25 µl，置2～8℃作用45～60分钟，观察结果。

**1.3 结果**

1.3.1兔出血症病毒及重组VP60蛋白与人各型红细胞不同温度下的凝集试验

将WF/2007株及重组1型VP60蛋白分别与人O型、A型、B型及AB型红细胞，不同温度下进行红细胞凝集试验。结果显示，WF/2007株及重组1型VP60蛋白在2～8℃条件下，用人O型、B型及AB型红细胞HA效价较高，人O型、B型红细胞的稳定性较好，其中WF/2007株与人O型、B型及AB型红细胞的平均HA效价（log2）分别比A型红细胞高1.33、1.33、1，重组1型VP60蛋白与人O型、B型及AB型红细胞平均HA效价分别比A型红细胞高1.67、1.67、1.33；相对于2～8℃，在20～25℃条件下，WF/2007株与人O型、A型、B型及AB型红细胞的平均HA效价分别降低了2、3、2、2，重组1型VP60蛋白与人O型、A型、B型及AB型红细胞的平均HA效价分别降低了2、3.33、2、2；在35～37℃条件下，未发生凝集反应（表1）。

将SC2020/04株及重组2型VP60蛋白分别与人O型、A型、B型及AB型红细胞，不同温度下进行红细胞凝集试验。结果显示，SC2020/04株及重组2型VP60蛋白在2～8℃条件下，用人B型、AB型红细胞测得的HA效价较高，人B型红细胞的稳定性较好，其中SC2020/04株与人B型、AB型红细胞的平均HA效价（log2）分别比人O型红细胞高4.33、4，比人A型红细胞高2.33、2，重组2型VP60蛋白与人B型、AB型红细胞的平均HA效价分别比人O型红细胞高4.67、4.33，比人A型红细胞高2.67、2.33；在20～25℃条件下，SC2020/04株与人O型、A型、B型及AB型红细胞的平均HA效价分别降低了6.33、6.33、4、4.33，重组2型VP60蛋白与人O型、A型、B型及AB型红细胞的平均HA效价分别降低了6.33、6.67、4、4；在35～37℃条件下，未发生凝集反应（表1）。

表1 兔出血症病毒及重组VP60蛋白与人各型红细胞不同温度下的凝集效价

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 组别 | 温度 | 血型 | | | | | | | |
| O | | A | | B | | AB | |
| 凝集  效价（log2） | 平均效价 | 凝集  效价（log2） | 平均效价 | 凝集  效价（log2） | 平均效价 | 凝集  效价（log2） | 平均效价 |
| WF/2007株 | 2～8℃ | 13、13、13 | 13 | 12、12、11 | 11.67 | 13、13、13 | 13 | 13、13、12 | 12.67 |
| 20～25℃ | 11、11、11 | 11 | 9、9、8 | 8.67 | 11、11、11 | 11 | 11、11、10 | 10.67 |
| 35～37℃ | 0、0、0 | 0 | 0、0、0 | 0 | 0、0、0 | 0 | 0、0、0 | 0 |
| SC2020/04株 | 2～8℃ | 8、8、7 | 7.67 | 9、10、10 | 9.67 | 12、12、12 | 12 | 12、12、11 | 11.67 |
| 20～25℃ | 2、1、1 | 1.33 | 3、3、4 | 3.33 | 8、8、8 | 8 | 8、7、7 | 7.33 |
| 35～37℃ | 0、0、0 | 0 | 0、0、0 | 0 | 0、0、0 | 0 | 0、0、0 | 0 |
| 重组1型VP60蛋白 | 2～8℃ | 14、14、14 | 14 | 13、12、12 | 12.33 | 14、14、14 | 14 | 14、14、13 | 13.67 |
| 20～25℃ | 12、12、12 | 12 | 9、9、9 | 9 | 12、12、12 | 12 | 12、11、11 | 11.67 |
| 35～37℃ | 0、0、0 | 0 | 0、0、0 | 0 | 0、0、0 | 0 | 0、0、0 | 0 |
| 重组2型VP60蛋白 | 2～8℃ | 8、9、8 | 8.33 | 10、10、11 | 10.33 | 13、13、13 | 13 | 13、13、12 | 12.67 |
| 20～25℃ | 2、2、2 | 2 | 3、4、4 | 3.67 | 9、9、9 | 9 | 9、9、8 | 8.67 |
| 35～37℃ | 0、0、0 | 0 | 0、0、0 | 0 | 0、0、0 | 0 | 0、0、0 | 0 |

1.3.2 兔出血症病毒及重组VP60蛋白与不同动物红细胞的凝集试验

将WF/2007株、SC2020/04株毒种及重组1型VP60蛋白、重组2型VP60蛋白，分别与人O型、人B型、兔、绵羊、鸡、小鼠、豚鼠及恒河猴红细胞，在2～8℃条件下进行红细胞凝集试验。结果显示，WF/2007株、SC2020/04株毒种及重组1型VP60蛋白、重组2型VP60蛋白仅与人红细胞发生凝集反应；与兔、绵羊、鸡、小鼠、豚鼠及恒河猴红细胞未见凝集反应（表2）。

表2 兔出血症病毒1型、2型与不同动物红细胞的凝集效价

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 类别 | | WF/2007株 | SC2020/04株 | 重组1型VP60蛋白 | 重组2型VP60蛋白 | SPF兔肝脏悬液 | Sf9细胞裂解物 |
| HA  效价（log2） | 人O型 | 13 | 8 | 14 | 9 | 0 | 0 |
| 人B型 | 13 | 12 | 14 | 13 | 0 | 0 |
| 兔 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 绵羊 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 鸡 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 小鼠 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 豚鼠 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 恒河猴 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

1.3.3 兔出血症病毒及重组VP60蛋白与阳性血清的血凝抑制试验

将WF/2007株、SC2020/04株毒种及重组1型VP60蛋白、重组2型VP60蛋白，分别与抗兔出血症病毒1型特异性血清、抗兔出血症病毒2型特异性血清、SPF兔血清进行血凝抑制试验。结果显示，分别以WF/2007株毒种或重组1型VP60蛋白配置4单位抗原进行血凝抑制试验，抗兔出血症病毒1型特异性血清、抗兔出血症病毒2型特异性血清、SPF兔血清血凝抑制效价均一致，分别为12、11、0；分别以SC2020/04株毒种或重组2型VP60蛋白配置4单位抗原进行血凝抑制试验，抗兔出血症病毒1型特异性血清、抗兔出血症病毒2型特异性血清、SPF兔血清血凝抑制效价也一致，分别为2、13、0（表3）。

表3 兔出血症病毒1型、2型与阳性血清的血凝抑制效价（HI（log2））

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 4单位抗原来源 | 血清 | | |
| 抗兔出血症病毒1型特异性血清 | 抗兔出血症病毒2型特异性血清 | SPF兔血清 |
| WF/2007株 | 12 | 11 | 0 |
| SC2020/04株 | 2 | 13 | 0 |
| 重组1型VP60蛋白 | 12 | 11 | 0 |
| 重组2型VP60蛋白 | 2 | 13 | 0 |

1.3.4 兔出血症病毒及重组VP60蛋白的特异性试验

4个血凝单位的WF/2007株毒种及重组1型VP60蛋白，与抗兔出血症病毒1型特异性血清中和后，红细胞不凝集，与抗兔出血症病毒2型特异性血清中和后，红细胞不凝集；抗兔出血症病毒1型特异性血清对照组、抗兔出血症病毒2型特异性血清对照组、SPF兔肝脏对照组不凝集，WF/2007株毒种对照组、重组1型VP60蛋白对照组完全凝集；表明WF/2007株毒种及重组1型VP60蛋白凝集红细胞的特性能够被抗兔出血症病毒1型特异性血清、抗兔出血症病毒2型特异性血清所抑制（表4）。

4个血凝单位的SC2020/04株毒种及重组2型VP60蛋白与抗兔出血症病毒1型特异性血清中和后，红细胞凝集，与抗兔出血症病毒2型特异性血清中和后，红细胞不凝集；抗兔出血症病毒1型特异性血清对照组、抗兔出血症病毒2型特异性血清对照组、SPF兔肝脏对照组不凝集，SC2020/04株毒种对照组、重组2型VP60蛋白对照组完全凝集，表明SC2020/04株毒种及重组2型VP60蛋白凝集红细胞的特性能够被抗兔出血症病毒2型特异性血清所抑制（表4）。

表4 兔出血症病毒及重组VP60蛋白的特异性试验

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 组别 | 孔号 | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| WF/2007株+抗兔出血症病毒1型特异性血清 | 血球不凝集 | 血球不凝集 | 血球不凝集 | 血球不凝集 | 血球不凝集 |
| WF/2007株+抗兔出血症病毒2型特异性血清 | 血球不凝集 | 血球不凝集 | 血球不凝集 | 血球不凝集 | 血球不凝集 |
| 重组1型VP60蛋白+抗兔出血症病毒1型特异性血清 | 血球不凝集 | 血球不凝集 | 血球不凝集 | 血球不凝集 | 血球不凝集 |
| 重组1型VP60蛋白+抗兔出血症病毒2型特异性血清 | 血球不凝集 | 血球不凝集 | 血球不凝集 | 血球不凝集 | 血球不凝集 |
| SC2020/04株+抗兔出血症病毒1型特异性血清 | 血球凝集 | 血球凝集 | 血球凝集 | 血球凝集 | 血球凝集 |
| SC2020/04株+抗兔出血症病毒2型特异性血清 | 血球不凝集 | 血球不凝集 | 血球不凝集 | 血球不凝集 | 血球不凝集 |
| 重组2型VP60蛋白+抗兔出血症病毒1型特异性血清 | 血球凝集 | 血球凝集 | 血球凝集 | 血球凝集 | 血球凝集 |
| 重组2型VP60蛋白+抗兔出血症病毒2型特异性血清 | 血球不凝集 | 血球不凝集 | 血球不凝集 | 血球不凝集 | 血球不凝集 |
| 抗兔出血症病毒1型特异性血清 | 血球不凝集 | 血球不凝集 | 血球不凝集 | 血球不凝集 | 血球不凝集 |
| 抗兔出血症病毒2型特异性血清 | 血球不凝集 | 血球不凝集 | 血球不凝集 | 血球不凝集 | 血球不凝集 |
| WF/2007株 | 血球凝集 | 血球凝集 | 血球凝集 | 血球凝集 | 血球凝集 |
| SC2020/04株 | 血球凝集 | 血球凝集 | 血球凝集 | 血球凝集 | 血球凝集 |
| SPF兔肝悬液上清 | 血球不凝集 | 血球不凝集 | 血球不凝集 | 血球不凝集 | 血球不凝集 |

**1.4** **讨论**

兔出血症病毒1型WF/2007株及重组1型VP60蛋白在2～8℃，用人O型、B型及AB型红细胞测得的HA效价较高，其中人O型、B型红细胞的稳定性较好且测得的HA效价相同；在20～25℃时，比在2～8℃测得的HA效价降低2～3个滴度。因此，选用人O型或B型红细胞在2～8℃条件下进行WF/2007株及重组1型VP60蛋白的凝集试验较为适宜。

兔出血症病毒2型SC2020/04株及重组2型VP60蛋白在2～8℃，用人B型、AB型红细胞测得的HA效价较高，其中人B型红细胞的稳定性较好；在20～25℃，人O型红细胞与SC2020/04株及重组2型VP60蛋白发生微弱的凝集反应；在室温用人O型红细胞进行玻片凝集试验时，部分兔出血症2型阳性肝脏未见红细胞凝集现象；因此，选用人B型红细胞在2～8℃条件下进行兔出血症病毒2型SC2020/04株及重组2型VP60蛋白的凝集试验较为适宜。

通过兔出血症病毒及重组VP60蛋白的血凝抑制试验及特异性试验发现，兔出血症病毒1型及重组1型VP60蛋白的血凝特性能被抗兔出血症病毒1型特异性血清、抗兔出血症病毒2型特异性血清抑制；兔出血症病毒2型及重组2型VP60蛋白的血凝特性能被抗兔出血症病毒2型特异性血清抑制，不能被抗兔出血症病毒1型特异性血清抑制。因此，特异性试验可以对WF/2007株、SC2020/04株及重组1型VP60蛋白、重组2型VP60蛋白进行特异性鉴别。

**2 RHDV1和RHDV2 RT-PCR方法**

2.1 材料

2.1.1 引物

表5 *vp60* 基因扩增引物序列

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 检测目的 | 引物序列（5´-3´） | 扩增大小（bp） |
| *RHDV1-vp60* 基因 | 上游引物：TATTCTGGGAACAACTCCAC | 347 |
| 下游引物：AACAGTCCGGTTGGATTTTG |
| *RHDV2-vp60* 基因 | 上游引物：CCCTGGAAGCAGTTCGTCAAAC | 748 |
| 下游引物：GATGTCAACAAGGTCTGACAG |

2.1.2 兔出血症病毒1型中国WF/2007株PCR扩增vp60基因靶序列

TATTCTGGGAACAACTCCACCAACGTGCTTCAGTTTTGGTACGCTAATGCTGGGTCTGCGATTGACAACCCTATCTCCCAGGTTGCACCAGACGGCTTCCCTGACATGTCATTCGTGCCCTTTAACAGCCCCAACATTCCGACCGCGGGGTGGGTCGGGTTTGGTGGTATTTGGAACAGTAACAACGGTGCCCCCGCTGCTACAACTGTGCAGGCCTATGAGTTAGGTTTTGCCACTGGGGCACCAAACAGCCTCCAGCCCACCACCAACACTTCAGGTGCACAGACTGTCGCTAAGTCCATTTATGCCGTGGTAACCGGCACAAACCAAAATCCAACCGGACTGTT（347bp）

2.1.3 兔出血症病毒2型中国SC2020/04株PCR扩增vp60基因靶序列

CCCTGGAAGCAGTTCGTCAAACGTGCTTGAGCTTTGGTATGCTAGTGCCGGGTCTGCAGCTGACAACCCCATCTCCCAAATTGCTCCAGATGGTTTCCCTGACATGTCATTTGTACCCTTCAGCGGTATCACCATCCCTACCGCAGGGTGGGTCGGGTTCGGTGGGATCTGGAACAGCAGTAATGGTGCCCCCTACGTCACGACCATGCAGGCTTATGAGTTGGGTTTTGCCACTGGAGTACCGAGCAACCCCCAACCCACCACCACCACTTCAGGGGCTCAGATTGTTGCCAAGTCCATCTATGGCGTTGCAAATGGCATAAACCAGACAACAGCCGGGTTGTTTGTGATGGCATCTGGTGTCATATCCACTCCAAACAGCAGTGCCACTACGTACACACCTCAGCCAAACAGGATTGTTAACGCACCTGGCACCCCTGCTGCTGCCCCTATTGGCAAGAACACACCCATCATGTTCGCGTCTGTTGTTAGGCGCACCGGCGACATCAACGCTGAGGCCGGTTCAACTAACGGAACCCAGTACGGCGCGGGATCACAACCGCTGCCGGTGACAATTGGACTTTCACTGAACAATTATTCATCGGCACTTATGCCTGGGCAGTTCTTCGTTTGGCAGCTAAACTTTGCTTCCGGCTTCATGGAACTTGGCTTGAGTGTTGATGGATACTTCTACGCGGGAACAGGGGCTTCAGCCACCCTCATTGACCTGTCAGACCTTGTTGACATC（748bp）

2.1.4 样本

疑似RHD1和RHD2病死兔肝脏（样品1和2）、RHDV1 *VP*60基因构建的重组质粒pMD19-T-VP60-1、RHDV2 *VP*60基因构建的重组质粒pMD19-T-VP60-2、无特定病原体（SPF）兔肝脏样品。

2.2 方法

2.2.1 肝脏样品总RNA提取

将10倍样品量的DEPC水加入脏器组织中，研磨成悬液，装入DEPC处理过的1.5 mL EP管中，-20℃以下反复冻融三次，在高速冷冻离心机上，以6000×g离心10 min，取上清200 µL，加入Trizol 700 µL，振荡混匀后，室温放置10 min，加入氯仿300 µL，振荡混匀后，室温放置1 min，以4℃ 11000×g离心15 min，取上层水相500 µL，加入等体积的异丙醇，混匀，-20℃以下放置15 min，以4℃ 11000×g离心10 min，去上清液，缓缓加入75%乙醇1mL洗涤，以4℃ 8000×g离心5 min，去上清液，室温干燥20 min，加入DEPC水20 µL，使充分溶解。或者按RNA抽提试剂盒的方法进行。

2.2.2 反转录反应

按20μL体系进行，含Anchored Oligo(dT)18 Primer(0.5μg/μL) 1μL，2×TS Reaction Mix 10μL，TransScriptRT/RI Enzyme Mix 1μL，gDNA Remover 1μL，RNase-free Water 2μL，RNA模板5μL。离心混匀，42℃孵育30分钟，产物于-18℃以下保存备用。

2.2.3 PCR反应

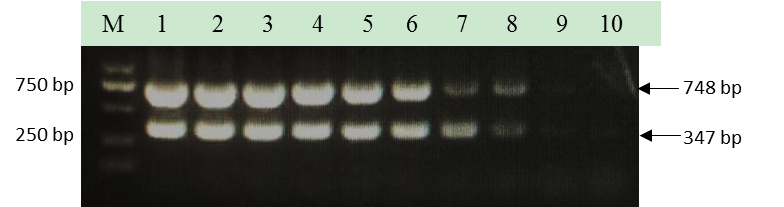
按25μL体系进行，含2×Rapid Taq Master Mix（南京诺唯赞生物科技股份有限公司购买）20μL，RHDV 1型上下游引物各1μL（浓度：10μmol/L），RHDV 2型上下游引物各1μL（浓度10μmol/L），反转录产物1μL。95℃ 3min，然后进入循环95℃ 15s，58℃ 15s，72℃ 30s，35循环，于72℃彻底延伸（5min），4℃保存。将PCR反应产物于1.2%琼脂糖凝胶进行电泳，电压为120V，时间为30min，紫外灯下观察结果，并进行拍照。

2.3 结果

2.3.1 RHDV1和RHDV2 RT-PCR的敏感性实验

分别将2种重组质粒pMD19-T-VP60-1 和pMD19-T-VP60-2定量，起始浓度分别为1109拷贝/μL，并将10倍比稀释后进行敏感性检测。结果显示，2种重组质粒的检测下限为100-1000拷贝/μL(图3)，该方法敏感性较高。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

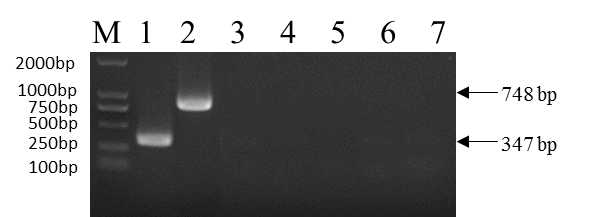


M:2000 Maker; 1～9: 1×109 copies /μL～1×101copies /μL; 10:阴性对照

图 3 分析敏感性检测

2.3.2 特异性试验

以RHDV1 cDNA 为模板进行PCR 反应，显示1 条大小为347 bp的特异性条带；以RHDV2 cDNA为模板进行PCR 反应，显示1 条大小为748 bp 的特异性条带。以支气管败血波氏杆菌、多杀性巴氏杆菌、产气荚膜梭菌、大肠杆菌的DNA为模板，均无条带产生(图4)。



M:2000Marker; 1:RHDV1; 2:RHDV2 ; 3:支气管败血波氏杆菌; 4:多杀氏巴氏杆菌; 5:产气荚膜梭菌; 6:大肠杆菌DNA ; 7:DEPC水

图 4 特异性试验

**3.** **兔出血症病毒1、2型双重荧光定量RT-PCR方法**

3.1 材料

3.1.1 引物

表 6 *vp60* 基因扩增引物和探针序列

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 检测目的 | 引物序列（5´-3´） | 扩增大小（bp） |
| *RHDV-vp60* 基因 | 上游引物：CGGTTTGCCGMCATTG | 78 |
| 下游引物：CCAAARCTSAAGCACGTTKG |
| RHDV1探针：VIC-AGTGCAAGTTATTCTGGSAACAACTC-BHQ1 |
| RHDV2探针：FAM-AACGCAAGTTTCCCTGGAAGCAGTTC-BHQ1 |

3.1.2 兔出血症病毒1型中国WF/2007株PCR扩增vp60基因靶序列:

CGGTTTGCCGACATTGACCATCGAAGAGGCAGTGCAAGTTATTCTGGGAACAACTCCACCAACGTGCTTCAGTTTTGG（78bp）

3.1.3 兔出血症病毒2型中国SC2020/04株PCR扩增vp60基因靶序列：

CGGTTTGCCGCCATTGACCACGACAGAGGCAACGCAAGTTTCCCTGGAAGCAGTTCGTCAAACGTGCTTGAGCTTTGG（78bp）

3.1.4 样本

待检兔肝脏、阳性对照RHDV1兔肝脏（或者RHDV1 VP60基因构建的重组质粒pMD19-T-VP60-1）、阳性对照RHDV2兔肝脏（或者RHDV2 VP60基因构建的重组质粒pMD19-T-VP60-2）、阴性对照无特定病原体（SPF）兔肝脏或DEPC处理水。

3.2 方法

3.2.1 肝脏样本 RNA的提取

将10倍样品量的DEPC水加入脏器组织中，研磨成悬液，装入DEPC处理过的1.5 mL EP管中，-20℃以下反复冻融三次，在高速冷冻离心机上，以6000×g离心10 min，取上清200 µL，加入Trizol 700 µL，振荡混匀后，室温放置10 min，加入氯仿300 µL，振荡混匀后，室温放置1 min，以4℃ 11000×g离心15 min，取上层水相500 µL，加入等体积的异丙醇，混匀，-20℃以下放置15 min，以4℃ 11000×g离心10 min，去上清液，缓缓加入75%乙醇1mL洗涤，以4℃ 8000×g离心5 min，去上清液，室温干燥20 min，加入DEPC水20 µL，使充分溶解。或者按RNA抽提试剂盒的方法进行。

3.2.2 RT-qPCR

按20 µL体系进行，含2X One Step RT-PCR Buffer Ⅲ 10 µL，TaKaRa Ex Taq HS (5 U/μl) 0.4 µL，PrimeScript RT Enzyme Mix Ⅱ0.4 µL，上、下游引物 (10 µmol/L)各0.6 µL，ROX Reference Dye II (50X) 0.4 µL，荧光探针（10 µmol/L）各0.8 µL，RNA产物2 µL，灭菌水4 µL。将PCR反应管转移到荧光定量PCR检测仪上进行扩增反应，反应条件设置以ABI Q-One 荧光定量PCR检测仪为例：42 ℃ 5 min，95 ℃ 10 s; 然后进入循环95℃ 5s, 60℃ 34s，40循环。对于其它型号的荧光定量PCR检测仪按实际机型进行反应程序设置，无需ROX的荧光定量PCR检测仪，反应液中以灭菌水替代ROX。

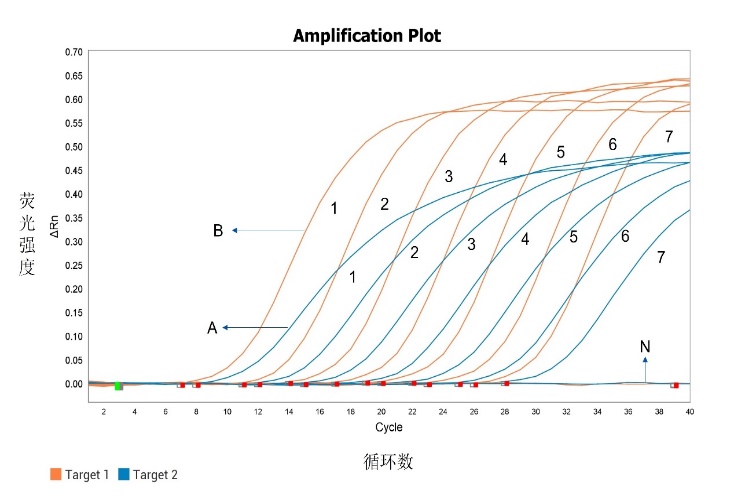
3.2.3 结果观察

试验检测结束后，根据收集的荧光曲线和Ct值判定结果。

3.3 结果

3.3.1双重RT-qPCR的敏感性实验

将十倍梯度稀释的质粒1×108～1×101 copies /μL作为模板进行荧光定量PCR和常规RT-PCR扩增。TaqMan RT-qPCR扩增结果显示，该方法的敏感性可达到100-1000 copies /μL（见图5）。

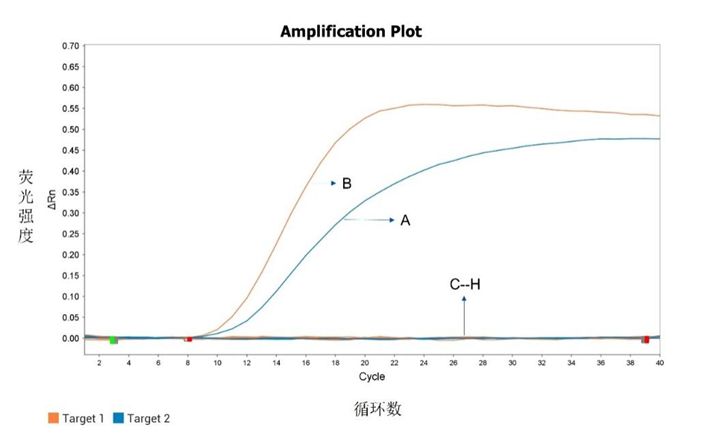


A：RHDV 1型； B：RHDV 2型；1～7：1×108 copies /μL～1×102copies /μL；N：阴性对照

图5双重RT- qPCR的敏感性试验

3.3.2 双重RT-qPCR的特异性试验

对兔多杀性巴氏杆菌、兔支气管败血波氏菌、沙门氏菌、绿脓杆菌、轮状病毒（RV）进行检测，同时设置阴阳性对照，结果显示（见图6）， 除RHDV 1型、RHDV 2型产生特异性的扩增曲线外，其他病原体及双蒸水均不产生扩增曲线，说明该方法特异性良好。



A：RHDV 1型； B：RHDV 2型; C：多杀性巴氏杆菌;

D：支气管败血波氏菌； E：沙门氏菌； F：绿脓杆菌；

G：轮状病毒； H：阴性对照

图6 双重 RT-qPCR的特异性试验

**（二）综述报告**

兔出血症（Rabbit Hemorrhagic Disease，RHD）是由兔出血症病毒（Rabbit Hemorrhagic Disease Virus，RHDV）感染兔引起的一种急性、烈性、高度接触性传染病，俗称“兔瘟”。RHDV属于杯状病毒科兔病毒属成员[[1](#_ENREF_1)-3]。1984年，兔出血症最先在中国公开报道[[4](#_ENREF_4)]，其后，1986年在欧洲意大利爆发[[5](#_ENREF_5), [6](#_ENREF_6)]，并以此为源头传遍整个欧洲并波及全球。当前引起RHD的RHDV有GI.1和GI.2两个基因型[[7](#_ENREF_7)]。截至2010年，经典RHDV分离株属于GI.1基因型。2010年，在欧洲发现了一种新的变异RHDV，该毒株在系统发育和抗原方面与GI.1基因型不同，被命名为RHDV2或RHDVb，属于GI.2基因型。

从首次报道RHDV到现在的30多年里，RHDV持续发生遗传变异。1998年Capucci等报道了RHDV发生抗原变异，并将变异株命名为RHDVa，次年，德国也报道了该变异株[[8](#_ENREF_8)]。研究者们根据系统发育关系，将RHDV毒株分为不同的基因组(分别命名为G1-G6，G6也称RHDVa)[[9](#_ENREF_9)]。然而2010年，G.Le-Recule等在法国兔场发现了一株兔出血症病毒新毒株，命名为RHDVb或RHDV2。该变异毒株RHDV2与经典的G1-G6型在遗传特性上有很大的差异，免疫经典毒株RHDV不能产生很好的交叉免疫保护作用，导致RHDV2在家兔和野兔中跨物种传播[[5](#_ENREF_5)]。在接下来的几年里，该毒株蔓延到意大利[[6](#_ENREF_6)]，西班牙[[10](#_ENREF_10)]，葡萄牙[[11](#_ENREF_11)]，英格兰和威尔士[[12](#_ENREF_12)]，苏格兰[[13](#_ENREF_13)]和德国[[14](#_ENREF_14)]。并于2014年底和2015年初，在欧洲大陆以外的亚速尔群岛被检测到[[14](#_ENREF_14)]，RHDV2取代经典RHDV的趋势正在扩大。2015年，Robyn N. Hall等研究者报道在澳大利亚首都直辖区也检测到RHDV2，该毒株与葡萄牙和亚速尔群岛报道的变异毒株类似[[15](#_ENREF_15)]。2016年，Aarón Martin-Alonso等指出RHDV2很有可能会从加那利群岛传播至非洲北部[[16](#_ENREF_16)]。由此可见，RHDV2的流行趋势正在世界范围内逐步扩大。2020年4月，我国首次爆发RHDV2，加强对经典毒株RHDV1和变异毒株RHDV2的监测，掌握国内病原流行情况，对维持养兔业健康至关重要。

**1 病原特性**

RHDV为无囊膜单股正链RNA病毒。RHDV衣壳呈球形，由180个VP60单体形成90个弓状二聚体构成，形成T=3的二十面体衣壳结构。RHDV衣壳模型表现出经典的杯状病毒特征：180个VP60 S区域组装形成内壳，90个突起则由VP60 P区以二聚体的形式组成，外直径在32-44nm之间，外直径最大44 nm，内壳28 nm。国内分离的RHDV2的全序列已提交至Genbank，并命名为RHDV-SC2020/0401，基因全长7443 核苷酸，5'非编码区有9 nt，3'非编码区有65 nt， 比RHDV1 3'非编码区多6 nt。RHDV2基因组包含两个开放阅读框（ORF1和ORF2）。ORF1的翻译产物经过加工切割后至少形成8个成熟的蛋白质分子，分别是非结构蛋白NSP1（2A）、NSP2（2B）、NSP3（2C核苷酸水解酶）、NSP4（3A）、NSP5（3B VPg）、NSP6（3C蛋白酶）、NSP7（3D RNA复制酶）和衣壳蛋白VP60[[17](#_ENREF_17)]。

RHDV2和RHDV同属于杯状病毒科兔病毒属成员，RHDV2与高致病性RHDV一样，可引起家兔出血症，两者的基因同源性虽然高达82.4%[[5](#_ENREF_5)]，但是系统发生树分析结果表明RHDV2与引起相同症状的RHDV亲缘关系较远，而与非致病性的RCV亲缘关系更近[[6](#_ENREF_6)]。因此研究者推测，RHDV2很可能是从非致病的兔病毒属成员演变而来。另外，毒力差异分析表明RHDV2对野兔的感染率和致死率明显低于家兔[[18](#_ENREF_18)]，这可能是因为家兔是RHDV2的天然宿主。

**2 流行病学特征**

经典RHDV仅感染家兔，包括肉兔、獭兔和毛兔等，主要危害6～8周龄以上兔，引起典型临床症状和死亡，死亡率高达90%。RHDV2感染宿主范围广，不但能够感染家兔，还能可感染某些品种的野兔、田鼠等野生啮齿类动物。在感染发病年龄方面，一旦群体感染，未断奶10日龄的仔兔、成年家兔乃至种兔均有发病死亡，死亡率高达90%。病死兔、带毒兔以及病死兔的内脏器官、肌肉、毛、血液、分泌物、排泄物是主要的传染源。其次，被病毒污染的饲料、饮水、用具等可携带病毒，也是重要的传染源。

杯状病毒可通过受污染的水和食物经粪-口传播，病毒可以结合呼吸道和消化道上皮细胞HBGA受体进入宿主身体。同科病毒杯状病毒科人诺如病毒就是通过与HBGA结合之后进入宿主体内[[19](#_ENREF_19)]。已有研究证明RHDV2可与HBGA的口袋位置P2区结合，这与诺如病毒GII型结合HBGA的方式相似，然而RHDV结合的是HBGA的P1区[[20](#_ENREF_20)]。这种不同的结合方式可能导致它们易感宿主的不完全相同。经典RHDV可直接通过接触感染动物分泌物、排泄物，或间接地通过污染的水、食物、饲养设备等造成感染[[21](#_ENREF_21)]。

**3 临床症状**

兔出血症以实质器官出血、淤血为主要特征。病毒首先侵害感染兔的肝脏，在其中大量复制，干扰细胞代谢，最终导致细胞死亡。病毒释放入血液，发生病毒血症而引起广泛的全身性损害，特别是引发急性弥散性血管内凝血和大量血栓形成，造成本病病程短促、死亡迅速和特征性的病理变化。在疾病病理方面，组织学变化可见肝、肺、肾和脾脏等重要组织器官的微血管形成弥漫性血管内凝血，间质水肿，实质细胞广泛变性和坏死 [[22](#_ENREF_22), [23](#_ENREF_23), 24]，此外，RHDV2伴有黄疸发生[[10](#_ENREF_10)]。

**4 诊断**

根据流行病学特点、典型的症状和病理变化，可作初步诊断。确诊需进行病原学检查和血清学试验。经典RHDV（GI.1）和RHDV2（GI.2）毒株均可用以下方法进行诊断，主要有临床检查和实验室检查。一般先通过流行病学、临床症状、剖检病变等临床检查对发病症状进行观察，然后通过利用血凝、血凝抑制试验，ELISA 试验以及分子生物学等试验方法进行实验室检查来最终确诊。

**4.1 临床观察**

尸检病死兔子，观察有无兔出血症的经典症状：气管弥漫性出血，鼻腔及气管充满血样泡沫，肺肿大出血，肾淤血并有出血点，心脏淤血、心包膜有点状出血，肝灰白肿大出血、脾脏肿大等。通过对发病症状的临床观察，仅能对疾病做出初步诊断，最终还是需要实验人员通过实验室分子生物学等技术手段来进行确诊。

**4.2 实验室诊断**

兔出血症急性死亡兔的肝脏和脾脏中含有较高浓度的RHDV，因此，可以通过一些试验方法来进行诊断。鉴于还未建立体外敏感细胞来培养RHDV，目前实验室检测病原的主要方法是反转录聚合酶链反应（RT-PCR）和基于单克隆抗体（MAbs）的夹心酶联免疫试验（ELISA）。以上两种方法需要筛选和应用特异性引物和单抗区分不同型的RHDV。目前看来，RT-PCR是一种高度敏感的方法，比其他方法更敏感、实用和快速，在兔出血症的净化和防控方面将具有广阔的应用前景。RHDV能凝集人红细胞，所以红细胞凝集（HA）试验也是检测RHDV常用方法，但是该方法不能区分不同型的RHDV，同时还需要考虑一些RHDV毒株没有凝集人红细胞特性，容易造成假阴性的结果。家兔接种是经典的诊断方法，目前家兔接种仍是RHDV分离、增殖和毒力测定的唯一方法，但考虑到动物福利，进行常规诊断应该避免使用这种方法。近几年，研究者建立的检测RHDV胶体金免疫层析技术具有简便、快速、特异、灵敏等优点，为兔出血症的现场检测和快速诊断提供了有效检测工具，非常适合于在基层实验室和养殖户推广应用，将具有广阔的应用前景。

兔出血症血清学诊断有三种基本技术，即血凝抑制试验（HI）、间接ELISA（I-ELISA）和竞争ELISA（C-ELISA）。这些方法还能区分之前未感染兔出血症的家兔是否有经典RHDV和 RHDV2的感染或者是否免疫过疫苗。每种方法都有其优缺点，考虑到获取试剂的难易程度和试验技术的复杂度，HI是最方便实用的方法，其次分别是I-ELISA和C-ELISA。检测大量样品时，两种ELISA方法比HI试验快速且更易于操作。理想的兔出血症血清学方法是使用特异性抗RHDV单克隆抗体的C-ELISA，该方法的特异性明显高于其他两种方法。

兔出血症的血清学诊断比较复杂。首先是针对的病原不同，有经典RHDV和RHDV2。其次，经典RHDV和RHDV2之间存在部分相关性抗原；不同兔子个体间抗体反应存在一定差异等。因此，血清学诊断方法应该使用针对经典RHDV和RHDV2的特异性免疫试剂。

**5 防控**

目前，兔出血症无有效的药物用于防治。与其他动物重大疫病预防控制相同，兔出血症也应以生物安全防控为主，其次依靠相关疫苗等产品。针对经典兔出血症，疫苗免疫是预防和控制的重要手段；针对RHDV2引起的兔出血症2型，国内还未有相关疫苗。因此，针对目前我国处于经典兔出血症和兔出血症2型同时流行的局面，应采取严格的生物安全防控措施，结合及时诊断、相关疫苗科学免疫以及抗体筛查等，最终在疫病防控中取得理想效果。

参考文献

[1] Le Gall-Reculé Ghislaine, Zwingelstein Françoise, Fages Marie-Philippe, et al.Characterisation of a non-pathogenic and non-protective infectious rabbit lagovirus related to RHDV[J]. Virology, 2011,410(2):395-402.

[2] Capucci Lorenzo, Fusi Paola, Lavazza Antonio, et al. Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic[J]. Journal of Virology, 1996,70(12):8614-8623.

[3] Bergin Ingrid L, Wise Annabel G, Bolin Steven R, et al. Novel calicivirus identified in rabbits, Michigan, USA[J]. Emerg Infect Dis, 2009,15(12):1955-1962.

[4] Liu SJ, Xue HP, Pu BQ, et al. A new viral disease in rabbits[J]. Anim Husb Vet Med, 1984,16(16):253-255.

[5] Le Gall-Reculé Ghislaine, Lavazza Antonio, Marchandeau Stéphane, et al. Emergence of a new lagovirus related to rabbit haemorrhagic disease virus[J]. Veterinary research, 2013,44(1):81.

[6] Puggioni Giantonella, Cavadini Patrizia, Maestrale Caterina, et al. The new French 2010 Rabbit Hemorrhagic Disease Virus causes an RHD-like disease in the Sardinian Cape hare (Lepus capensis mediterraneus)[J]. Veterinary research, 2013,44(1):96.

[7] Capucci Lorenzo, Fallacara Francesca, Grazioli Santina, et al. A further step in the evolution of rabbit hemorrhagic disease virus: the appearance of the first consistent antigenic variant[J]. Virus research, 1998,58(1):115-126.

[8] Schirrmeier H, Reimann I, Köllner B, et al. Pathogenic, antigenic and molecular properties of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) isolated from vaccinated rabbits: detection and characterization of antigenic variants[J]. Archives of Virology, 1999,144(4):719-735.

[9] Le Gall-Reculé G, Zwingelstein F, Laurent S, et al. Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus in France between 1993 and 2000, and the characterisation of RHDV antigenic variants[J]. Archives of Virology, 2003,148(1):65-81.

[10] Dalton Kevin P, Nicieza Inés, Balseiro Ana, et al. Variant rabbit hemorrhagic disease virus in young rabbits, Spain[J]. Emerg Infect Dis, 2012,18(2):2009-2012.

[11] Hemorrhagic Rabbit. New variant of rabbit hemorrhagic disease virus, Portugal, 2012–2013[J]. N Engl J Med, 2013,19(11): 1888-1897.

[12] Westcott David G, Frossard Jean-Pierre, Everest David, et al. Incursion of RHDV2-like variant in Great Britain[J]. Veterinary record, 2014,174(13):333-333.

[13] Baily Johanna L, Dagleish Mark P, Graham Manus, et al. RHDV variant 2 presence detected in Scotland[J]. Veterinary record, 2014,174(16):411-411.

[14] Duarte Margarida, Carvalho Carina, Bernardo Susana, et al. Rabbit haemorrhagic disease virus 2 (RHDV2) outbreak in Azores: Disclosure of common genetic markers and phylogenetic segregation within the European strains[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2015,35:163-171.

[15] Hall Robyn N, Mahar Jackie E, Haboury Stephanie, et al. Emerging rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDVb), Australia[J]. Emerging infectious diseases, 2015,21(12):2276.

[16] Martin-Alonso Aarón, Martin-Carrillo Natalia, Garcia-Livia Katherine, et al. Emerging rabbit haemorrhagic disease virus 2 (RHDV2) at the gates of the African continent[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2016,44:46-50.

[17] Dalton Kevin Paul, Abrantes Joana, Lopes AM, et al. Complete genome sequence of two rabbit hemorrhagic disease virus variant b isolates detected on the Iberian Peninsula[J]. Archives of Virology, 2015,160(3):877-881.

[18] Camarda A, Pugliese N, Cavadini P, et al. Detection of the new emerging rabbit haemorrhagic disease type 2 virus (RHDV2) in Sicily from rabbit (Oryctolagus cuniculus) and Italian hare (Lepus corsicanus)[J]. Research in Veterinary Science, 2014,97(3):642-645.

[19] Tan Ming, Jin Miao, Xie Huaping, et al. Outbreak studies of a GII‐3 and a GII‐4 norovirus revealed an association between HBGA phenotypes and viral infection[J]. Journal of medical virology, 2008,80(7):1296-1301.

[20] Leuthold Mila M, Dalton Kevin P, Hansman Grant S. Structural analysis of a rabbit hemorrhagic disease virus binding to histo-blood group antigens[J]. Journal of Virology, 2015,89(4):2378-2387.

[21] Abrantes Joana, Van Der Loo Wessel, Le Pendu Jacques, et al. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review[J]. Veterinary research, 2012,43(1):12.

[22] Lavazza A, Scicluna MT, Capucci L. Susceptibility of hares and rabbits to the European brown hare syndrome virus (EBHSV) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) under experimental conditions[J]. Journal of veterinary medicine. Series B, 1996,43:401-409.

[23] McIntosh Michael T, Behan Shawn C, Mohamed Fawzi M, et al. A pandemic strain of calicivirus threatens rabbit industries in the Americas[J]. Virology journal, 2007,4(1):96.

[24] Lopes Ana M, Correia Jorge, Abrantes Joana, et al. Is the new variant RHDV replacing genogroup 1 in Portuguese wild rabbit populations?[J]. Viruses, 2014,7(1):27-36.

[25] Le Gall-Recule G., Zwingelstein F., Boucher S., et al. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France [J].Vet. Rec., 2011, 168:137-138.

[26] Duarte Margarida Dias, Carvalho Carina L, Barros Silvia C, et al. A real time Taqman RT-PCR for the detection of rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2)[J]. Journal of Virological Methods, 2015,219:90-95.

[27] Montbrau C., Padrell M. and Ruiz M. C. Efficacy and safety of a new inactivated vaccine against the rabbit haemorrhagic disease virus 2-like variant (RHDV-2)[C]//Yinghe Qin,Fuchang Li and Thierry Gidenne. Proceedings of the 11th word rabbit congress. Qingdao:Chinese Branch of WRSA, 2016:237.

**（三）技术经济论证**

江苏省农业科学院联合中国动物卫生与流行病学中心，根据前期的研究结果及技术的初步应用，建立了兔出血症病毒1型和2型的检测方法和鉴别检测方法，起草了《兔出血症诊断技术》农业行业标准修订稿，可对兔出血症病毒1型和2型进行快速诊断。首先通过流行病学特性研究、临床症状、剖检病变等临床检查对发病症状进行观察，然后利用血凝试验以及核酸识别技术等试验方法进行实验室检查来最终确诊。该标准所涉及的相关诊断技术所用所有仪器设备及试剂均可通过正规渠道购买获取，仪器设备为常规仪器，试剂为常用试剂，因此，可以很便捷地开展兔出血症1型和2型的诊断，有利于技术的推广应用。

**（四）预期的经济效果**

江苏省农业科学院联合中国动物卫生与流行病学中心修订的《兔出血症诊断技术》农业行业标准，经实践证实可对兔出血症1型和2型进行快速诊断，及时为当地疫情的控制争取宝贵时间，以便尽快采取措施，减少该病的流行和扩散，降低经济损失。本标准具有实用性和可操作性，发布后，每年可创造巨大的经济效益。

# 四、采用国际标准和国外先进标准的程度，以及与国际、国内同类标准水平的对比情况，或与测试的国外样品有关数据对比情况

在本标准制订过程中，我们参考了OIE《陆生手册》3.6.2兔出血症章节中的内容。OIE《陆生手册》诊断技术的病原鉴定中涉及到红细胞凝集试验、RT-PCR、电子显微镜检查、免疫染色、ELISA、免疫印迹和动物接种等方法。我们综合各种方法的可行性与便捷性等因素，并以实验室保存的RHDV1和RHDV2中国流行毒株进行实验验证，建立了红细胞凝集试验、RT-PCR和TaqMan实时荧光定量RT-PCR方法，并将其作为标准中的主要诊断技术。

# 五、与现行的法律、法规和强制性国家标准的关系

主要说明标准与相应法律法规和强制性标准之间的衔接、协调情况。列出与标标准密切相关的法律法规、强制性标准的名称和编号。

本标准是为了更好地贯彻《中华人民共和国动物防疫法》、《重大动物疫情应急条例》以及有关的法律法规，加快我国动物防疫标准化工作进程，适应兔出血症1型和2型防控工作的需要，填补了我国兔出血症病毒2型鉴定及兔出血症病毒1型和2型鉴别无标准可依的空白，对快速诊断并控制兔出血症的发生和流行具有重要意义。

# 六、重大分歧意见的处理经过和依据

说明各方面专家对标准主要内容（如参数、指标、试验方法）有哪些重大分歧，以及标准起草单位在修改完善标准过程中，对专家分歧意见的处理主要依据和处理结果。对同一方法或问题有不同解决方案的应讨论出最佳方案。

在本标准的制定过程中，相关专家没有提出重大分歧意见。

# 七、标准性质（强制性，推荐性）的建议，特别是对建议批为强制性标准的理由应充分说明

严格按照立项下达的性质编写。无需增加解释文字。建议将本修订标准批准为推荐性标准。

该技术标准的制定，试验数据充分，科学性强，并经过实际应用，可作为修订行业标准在兔出血症病毒1型和2型的诊断工作中进一步推广应用。

# 八、贯彻标准的要求和建议措施（组织实施、技术措施、过渡办法等）

建议以培训班的形式推广本标准。

# 九、废止现行有关标准的建议；

本申请标准为修订中华人民共和国农业行业标准《兔病毒性出血病血凝和血凝抑制试验方法》（NY/T 572-2016）和《兔病毒性出血症病毒RT-PCR检测方法》（NY/T 2960-2016），本申请标准一旦通过，原标准即废止。

# 十、其他应予说明的事项。

主要包括标准项目任务完成中有关**标准名称变更**、对有争议问题、遗留问题处理、尚需探讨的问题和制定或修订配套标准的说明等。

无。